

**NASTAVNO – NAUČNOM VEĆU
HEMIJSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Odlukom Nastavno – naučnog veća Hemijskog fakulteta od 9. novembra 2017. godine određeni smo u komisiju za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske teze Ana Marije J. Balaž, master biohemičara, pod naslovom:

„Proteinski inženjering celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u cilju povećanja oksidativne stabilnosti za primenu u biokatalizi“

Na osnovu ove odluke Nastavno-naučnom veću, podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

A. Biografski podaci o kandidatkinji

Ana Marija Balaž je rođena 14. jula 1987. godine u Zrenjaninu, Srbija. Osnovnu školu „2.Oktobar“, kao i Gimnaziju, prirodno – matematički smer, završila je u Zrenjaninu. Osnovne studije je pohađala na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar u periodu od 2006. do 2013. godine, kada je diplomirala sa radom pod nazivom „Kloniranje celobiozo dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* kao himere sa zelenim fluorescentnim proteinom iz *Aequera victoria*“ sa prosečnom ocenom 7,74 i ocenom 10 na završnom radu. Master studije biohemije na Hemijskom fakultetu upisuje 2013. godine, koje završava 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,00 i ocenom 10 na master radu „Kloniranje celobiozo dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* kao himere sa zelenim fluorescentnim proteinom iz *Aequera victoria* i njihova ekspresija na površini ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*“, čime stiže zvanje master biohemičar.

Ana Marija Balaž je student doktorskih studija na smeru biohemija na Hemijskom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, a pod rukovodstvom vanrednog profesora dr Radivoja Prodanovića radi na temama iz proteinskog inženjeringa i metodama visoko efikasne pretrage gena celobioza – dehidrogenaze.

Od 01.06.2015. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik na Centru za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju.

Tokom izrade doktorske disertacije, u okviru bilateralnog projekta Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Instituta za Molekularnu biotehnologiju RWTH Ahen Univerziteta kandidatkinja je boravila na Fraunhofer institutu za Molekularnu Biologiju i Primenjenu ekologiju, Ahen, Nemačka. Tokom tromesečnog boravka u Nemačkoj bavila se dirigovanom evolucijom celobioza dehidrogenaze i razvojem fluorescentnog eseja za detekciju mutanata celobioza dehidrogenaze upotrebom protočne citometrije.

B. Objavljeni naučni radovi i saopštenja

Dosadašnje rezultate istraživanja kandidatkinja je publikovala u sledećim naučnim radovima i saopštenjima.

Radovi u međunarodnim časopisima sa SCI liste (M23)

1. Vojin M. Tadić, Ana Marija J. Balaž, Marija P. Petrić, Snežana M. Milošević, Nevena D. Zelenović, Martin Z. Raspor, Jovan M. Tadić, Radivoje M. Prodanović, „Cloning of the gene for a carbohydrate oxidase from *Lactuca sativa* in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*“, Hemijska Industrija, Savez hemijskih inženjera, vol. 69, no. 6, pp. 689 – 701, DOI: 10.2298/HEMIND14082300T (2015), *in press* (2014).

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodima (M34)

1. Ana Marija Balaž, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović. Semi rational design of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* for increased oxidative stability. Conference SRBBM, Temisvara, Romania (2017).
2. Ana Marija Balaž, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović. Semi rational design of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* for increased oxidative stability and high – throughput screening of library mutants. Conference of Serbian Biochemical Society, Belgrade, Serbia (2017).

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodima (M64)

1. Ana Marija Balaž, Radivoje Prodanović. Cloning and expression cellobioso dehidrogenaze from *Phanerochaete chrysosporium* as himera with enhanced green fluorescent protein from *Aequoera victoria*. 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia, Niš 2014, Book of Abstracts p.125 (2014).
2. Ana Marija Balaž, Raluca Ostafe, Radivoje Prodanović. Oxidative stability of cellobiose dehidrogenaze. 4nd Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade 2016, Book of Abstracts (2016).
3. Ana Marija Balaž, Raluca Ostafe, Radivoje Prodanović. Semi rational design of cellobiose dehidrogenaze from *Phanerochaete chrysosporium* for increased oxidative stability. 6th Conference of Serbian Biochemical Societ, Belgrade 2016, Book of Abstracts (2016).

C. Obrazloženje teme

1. Naučna oblast

Naučna oblast je biohemija (biohemijski aspekti uticaja aminokiselinske sekvence enzima na aktivnost i stabilnost), za koju je matičan Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu.

2. Predmet rada

Predmet doktorske disertacije je dobijanje mutanata celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u cilju povećanja oksidativne stabilnosti i aktivnosti enzima u odnosu na njegov prirodni oblik, za primenu u biokatalizi i dobijanju laktobionske kiseline, kao i razvoj i optimizacija nove metode visoko efikasne pretrage biblioteke mutiranih varijanti gena celobiozo-dehidrogenaze, zasnovanih na detekciji aktivnosti enzima eksportovanog na površini ćelija kvasca protočnom citometrijom i fluorimetrijom.

3. Naučni cilj istraživanja

U okviru ove teze formulisano je nekoliko ciljeva:

- a) Kloniranje i ekspresija celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* Invsc1 i EBY 100.

- b) Pravljenje biblioteka mutiranih varijanti gena celobioza – dehidrogenaze semi racionalnim pristupom za dobijanje slučajnih mutacija na tačno definisanim pozicijama i njihova ekspresija u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* Invsc1 u vidu vanćelijskog enzima.
- c) Razvoj enzimskog eseja za celobioza – dehidrogenazu u mikrotitar pločama za detekciju stabilnosti enzima u uslovima oksidativnog stresa.
- d) Testiranje aktivnosti mutiranih varijanti enzima u uslovima oksidativnog stresa i selekcija varijanti gena sa povećanom oksidativnom stabilnošću u odnosu na prirodni oblik enzima za konstruisanje varijanti enzima koji poseduju više od jedne selektovane mutacije koja je dovela do povećanje oksidativne stabilnosti.
- e) Prečišćavanje i detaljna strukturna i kinetička karakterizacija mutiranih varijanti enzima.
- f) Kloniranje i ekspresija celobioza – dehidrogenaze u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 u vidu himere sa AGA 2 i/ili zelenim fluorescentnim proteinom eksportovane na površinu ćelija kvasca.
- g) Pravljenje biblioteke mutiranih varijanti gena celobioza – dehidrogenaze metodom slučajnih mutacija i njena ekspresija u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 u vidu himere sa AGA 2 proteinom eksportovane na površinu ćelija kvasca.
- h) Razvoj i optimizacija fluorescentnog enzimskog eseja za celobioza – dehidrogenazu pogodnog za korišćenje u protočnoj citometriji.
- i) Razvoj i optimizacija metode za visoko efikasno pretraživanje biblioteke mutiranih varijanti gena celobioza – dehidrogenaze eksprimiranih u *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 zasnovane na razvijenom fluorescentnom enzimskom eseju i protočnoj citometriji.
- j) Pretraživanje dobijenih biblioteka mutiranih varijanti gena celobioza – dehidrogenaze, eksprimiranih na površini kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY 100, za dobijanje mutiranih varijanti enzima sa povećanom aktivnošću u odnosu na prirodni oblik enzima.
- k) Kloniranje i ekspresija prirodnog oblika enzima i odabranih mutanata celobioza – dehidrogenaze u kvascu *Pichia pastoris*, njihovo prečišćavanje i detaljna karakterizacija enzimskih varijanti.
- l) Primena dobijenih mutanata i prirodnog oblika enzima u biokatalizi i za proizvodnju laktobionske kiseline.

4. Metoda ili metode istaživanja

U okviru izrade doktorske teze biće korišćene sledeće eksperimentalne tehnike, s' obzirom na zahteve iskazane u ciljevima:

- a) **Biohemijske metode:** hromatografske metode (jonoizmenjivačka hromatografija, gel filtracija) i ultrafiltracija u cilju izolovanja i prečišćavanja proteina; elektroforetske metode analize proteina (SDS PAGE i nativna PAGE); metode merenja enzimske aktivnosti u mikrotitar pločama u ELISA čitaču; detekcija fluorescencije upotrebom fluorimetra i protočnog citometra (fluorescencijom aktivirano ćelijsko sortiranje – FACS).
- b) **Metode molekularne biologije:** PCR metode za umnožavanje gena i pravljenje biblioteka mutiranih varijanti gena; restrikciona digestija i ligacija gena u odgovarajuće vektore; transformacija bakterija i kvasaca vektorima sa ukloniranim genima.
- c) **Mikrobiološke metode:** gajenje sojeva bakterija i kvasaca na tečnim i čvrstim podlogama; heterologna ekspresija proteina u kvascima.

5. Aktuelnost problematike u svetu

Jedan od najizučavanijih vanćelijskih enzima gljive bele truleži, *Phanerochaete chrysosporium*, je celobioza – dehidrogenaza (CDH, EC 1.1.99.18), monomer koji sačinjavaju dva domena, flavinski domen koji kao prostetičnu grupu sadrži FAD i hem domen u čiji sastav ulazi citohrom b, koji su međusobno povezani kratkim peptidnim fragmentom koji je bogat ostacima serina i treonina ^[1,2]. Fiziološka uloga celobioza – dehidrogenaze se ogleda u degradaciji celuloze i lignina u kooperaciji sa drugim celulolitičkim enzimima jer CDH katalizuje oksidaciju celobioze (Glc – β – 1,4 Glc) i drugih β – 1,4 – vezanih disaharida i oligosaharida do odgovarajućih laktone koji se potom spontano hidrolizuju do karboksilnih kiselina ^[3]. Smatra se da zajedno sa celulazama i lignin peroksidazama CDH igra važnu ulogu u biološkoj razgradnji nerastvorne celuloze od strane gljiva bele truleži ^[4,5]. Zbog sposobnosti da redukuje veliki broj akceptora elektrona, celobioza – dehidrogenaza ima primenu i kao biosenzor ukoliko je imobilizovana na redoks polimeru koji sadrži osmijum, pri čemu je akceptor elektrona sa FADH₂ elektroda i kao takav, enzim može da služi za određivanje koncentracije celobioze i laktoze, zbog čega su biosenzori bazirani na CDH našli primenu u

industriji hrane, posebno u određivanju količine laktoze. Biosenzori bazirani na CDH su izrazito stabilni, verovatno zbog niske proizvodnje vodonik peroksida od strane enzima, što ne narušava efikasnost elektrode, a takođe, za razliku od drugih biosenzora baziranih na enzimima, omogućava i veoma brz odgovor ^[6,7]. Da bi se poboljšala upotrebljivost CDH za razgradnju celuloze, proizvodnju celobionske i laktobionske kiseline kao i za merenje koncentracije disaharida neophodno je povećati njenu aktivnost i stabilnost, posebno oksidativnu. Jedan od glavnih izvora oksidativne nestabilnosti enzima jeste oksidacija amino kiselinskih ostataka metionina, cisteina, triptofana i tirozina dostupnih rastvaraču ^[8]. Zamenom tih amino kiselinskih ostataka nekim drugim moguće je povećati oksidativnu stabilnost enzima i njegovu upotrebljivost u biokatalizi. Da bi se to postiglo mogu se koristiti metode proteinskog inženjeringa i visoko efikasne pretrage biokatalizatora.

Proteinski inženjering najčešće podrazumeva promenu sekvence gena koji kodira određenu amino – kiselinsku sekvencu proteina u cilju promene proteinske aktivnosti i stabilnosti. Proteinski inženjering sadrži dva pristupa: dirigovana evolucija i racionalni dizajn. Metoda dirigovane evolucije ne zahteva prethodno poznavanje proteinske strukture i podrazumeva iterativne korake kreiranja biblioteke mutiranih varijanti gena metodom slučajnih mutacija i pretrage (skrininga) kreirane biblioteke za varijantama enzima koji imaju povećanu aktivnost i stabilnost. Racionalni dizajn, za razliku od dirigovane evolucije, podrazumeva poznavanje strukture enzima kako bi bilo moguće definisati amino kiselinski ostatak koji želimo da zamenimo nekim drugim amino kiselinskim ostatkom. U sklopu proteinskog inženjeringa najsporiji korak predstavlja sama metoda pretrage tj. skrininga biblioteke mutiranih varijanti gena ka varijantama enzima sa poboljšanim karakteristikama. Stoga je razvoj visoko efikasnih metoda pretrage ("*High-throughput screening systems*") biblioteka gena od ključnog značaja za uspeh metoda proteinskog inženjeringa u razvoju varijanata enzima sa poboljšanim karakteristikama ^[10]. Kako bi se obezbedila mogućnost izvođenja i praćenja velikog broja enzimskih reakcija u kratkom vremenskom periodu, ove metode moraju biti zasnovane na detekciji proizvoda reakcije fluorimetrijom usled potrebe za velikom osetljivošću, dok se same reakcije moraju izvoditi u malim reakcionim zapreminama (bunarčići mikrotitar ploča ili mikrokapljice vode u emulzijama vode u ulju).

Zeleni fluorescentni protein (GFP) iz meduze *Aequorea victoria* se naširoko upotrebljava kao prirodni fluorescentni marker za ekspresiju gena, lokalizaciju različitih proizvoda genske ekspresije i za identifikaciju količine eksprimiranih proteina. Hromofora GFP se sastoji od 3 amino kiselinska ostatka (65 – SerTyrGly – 67) koja osiguravaju fluorescenciju bez obzira na

organizam u kom su eksprimirani ^[9]. Ekspresijom enzima kao himere sa GFP se omogućava kvantitativno merenje količine proteina što uz merenje aktivnosti omogućava precizno određivanje specifične aktivnosti enzima.

I pored velikih mogućnosti, primena ovakvih metoda pretraživanja za razvoj biotehnoški važnih varijanata enzima je ograničena zbog brojnih problema kao što su nedostatak odgovarajućih fluorescentnih enzimskih eseja i odgovarajućih ekspresionih sistema. Zato je razvoj novih fluorescentnih enzimskih eseja i njihova adaptacija za pretragu biblioteke mutiranih varijanti gena u mikrotitar pločama i protočnom citometrijom od velike važnosti za uspešnost eksperimenata u proteinskom inženjeringu. Zbog svega toga su i dalje veoma aktuelna istraživanja u ovoj oblasti koja imaju za cilj poboljšanje selektivnosti i osetljivosti metode pretrage biblioteke mutiranih varijanti gena kako bi se povećala uspešnost pronalaznja najaktivnijih mutanta enzima u populaciji.

Reference:

1. Hallberg MB, Bergfors T, Bäckbro K, Pettersson G, Henriksson G, Divne C. A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *8*: 79 – 88; 2000.
2. Cohen JD, Bao W, Renganathan V, Subramaniam SS, Loehr TM. Resonance Raman spectroscopic studies of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys.* 341: 321 – 8; 1997.
3. Hallberg BM, Henriksson G, Pettersson G, Vasella A, Divne C. Mechanism of the reductive half reaction in cellobiose dehydrogenase. *Biol. Chem.* 278:7160 – 7166; 2003.
4. Blanchette RA, Nilsson T, Daniel G, Abad A. Biological Degradation of Wood. In *Archaeological Wood*. American Chemical Society. 225: 141 – 174; 1989.
5. Call HP, Mücke I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. *Journal of Biotechnology.* 53: 163 – 202; 1997.
6. Cameron MD, Aust SD. Cellobiose dehydrogenase – an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzyme and Microbial Technology.* 28: 129 – 138; 2001.
7. Henriksson G, Sild V, Szabó IJ, Pettersson G, Johansson G. Substrate specificity of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1383: 48 – 54; 1998.
8. Kim, Y. H.; Berry, A. H.; Spencer, D. S.; Stites, W. E. Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* 14: 343–347; 2001.
9. Shimomura O, Chalfie M, Tsien RY. The green fluorescent protein: discovery, expression and development. *The Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm, Sweden*; 2008.

10. R. Ostafe, R. Prodanovic, J. Nazor, R. Fischer, "Ultra-High-Throughput Screening Method using Fluorescence Activated Cell Sorting for the Directed Evolution of Glucose Oxidase", *Chemistry & Biology*, 21: 414-421 (2014).

6. Očekivani rezultati

U okviru izrade doktorske disertacije, očekuje se razvoj nove metode heterologne ekspresije CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* u vidu himere sa AGA 2 i zelenim fluorescentnim proteinom eksprimirane na površinu ćelija kvasca. Nakon razvoja ekspresionih metoda očekuje se i dobijanje biblioteke mutiranih varijanti gena CDH u ovim ekspresionim sistemima metodama nasumične mutacije gena i racionalnog dizajna.

Takođe se očekuje i razvoj novog fluorescentnog enzimskog eseja za CDH pogodnog za upotrebu u protočnoj citometriji i njegova primena u visoko efikasnoj pretrazi biblioteke mutiranih varijanti gena CDH u cilju pronalaženja mutanata enzima sa povećanom aktivnošću u odnosu na prirodan oblik enzima.

Prirodni oblik enzima i mutanti CDH će biti klonirani i eksprimirani u kvascu *Pichia pastoris* kako bi se dobila veća količina enzima neophodna za prečišćavanje i detaljnu kinetičku karakterizaciju, a samim tim i za direktnu upotrebu enzima u biokatalizi.

Kao finalni rezultat ovih eksperimenata se očekuje pronalaženje, dobijanje i detaljna karakterizacija mutanata celobioza – dehidrogenaze koji su oksidativno stabilniji i aktivniji u odnosu na prirodni oblik enzima, te samim tim i pogodniji za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, u biosenzorima i biogorivnim ćelijama. Najstabilniji i najaktivniji mutanti će biti upotrebljeni za dobijanje laktobionske kiseline.

Zaključak

Na osnovu svega napred iznetog, Komisija je mišljenja da je predložena tema doktorske teze pod naslovom:

„Proteinski inženjering celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u cilju povećanja oksidativne stabilnosti za primenu u biokatalizi“

naučno zasnovana i da kandidat Ana Marija Balaž, master biohemičar, ispunjava sve uslove za početak izrade doktorske teze za sticanje akademskog zvanja DOKTOR BIOHEMIJSKIH

NAUKA. Zato preporučujemo Nastavno – naučnom veću Hemijskog fakulteta u Beogradu da odobri kandidatu izradu doktorske teze pod navedenim naslovom. Za mentora predlažemo dr Radivoja Prodanović, vanrednog profesora Hemijskog fakulteta.

Članovi Komisije:

1. dr Radivoje Prodanović, vanredni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu
(mentor)

2. dr Marija Gavrović Jankulović, redovni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

3. dr Natalija Polović, vanredni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

4. dr Olivera Prodanović, naučni saradnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

U Beogradu,

18.12.2017.